

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

SULFATED POLYSACCHARIDE DS 4152 AND VASCULARIZATION INHIBITOR AND ANTITUMOR AGENT CONTAINING THE SAME

Patent Number: JP63119500
Publication date: 1988-05-24
Inventor(s): INOUE KAZUKIYO; others: 03
Applicant(s): DAI ICHI SEIYAKU CO LTD
Requested Patent: JP63119500
Application Number: JP19870125443 19870522
Priority Number(s):
IPC Classification: C07K15/14; A61K31/725; A61K37/02; C08B37/00; C12P19/04
EC Classification:
Equivalents: JP2544136B2

Abstract

NEW MATERIAL:A sulfated polysaccharide DS 4152 having the following physical and chemical properties. Molecular weight, 29,000+ or -3,000; elemental analysis (%), C 24.42-25.76, H 3.34-3.98; N 0.51-0.89, S 10.6-11.7, P 0.77-1.06; sugar content, 57+ or -3; protein content, 1+ or -0.5; specific rotation, $[\alpha]_D^{25} = -37$ or -1 deg. (0.5% aqueous solution); main IR absorption band, 1,240, 840 (shoulder), 810 (cm^{-1} ; KBr); solubility, easily soluble in water and almost insoluble in organic solvents such as ether, benzene, chloroform, methanol, ethanol, etc.; pH, 6-8 (3% aqueous solution); etc.

USE:A vascularization inhibitor and antitumor agent. The activity can be promoted when combined with a steroid drug.

PREPARATION:For example, pyrogenic substance, etc., having a molecular weight of $\geq 15 \times 10^4$ are removed by a proper molecular weight fractionation method from DF 4639 separated from a cultured product of *Arthrobacter* sp. AT (FERM P-5255).

Data supplied from the esp@cenet database - I2

1988

① 日本国特許庁 (J P)

② 特許出願公開

③ 公開特許公報 (A)

昭63-119500

④ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑤ 公開 昭和63年(1988)5月24日

C 07 K 15/14
A 61 K 31/725ABL
ABY

8318-4H

7252-4C ※ 審査請求 未請求 発明の枚 5 (全13頁)

⑥ 発明の名称 硫酸化多糖体 D S 4152並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

⑦ 特 願 昭62-125443

⑧ 出 願 昭62(1987)5月22日

⑨ 優先権主張 ⑩ 昭61(1986)5月23日 ⑪ 日本 (J P) ⑫ 特願 昭61-118847

⑬ 発 明 者 井 上 和 彦 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑭ 発 明 者 田 中 紀 子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑮ 発 明 者 是 永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

⑯ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

⑰ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

最終頁に続く

明 細 書

グラクトース環基)

1. 発明の名称

蛋白含量 (%) : 1 ± 0.5 (ローリー・フォ

硫酸化多糖体 D S 4152 並びにこれを含有

リン酸、牛血清アルブミン

する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

(標準)

2. 特許請求の範囲

(4) 比旋光度

1. ナトリウム塩として下記の物理化学的性質

 $(\alpha)_D^{25} -37^\circ \pm 1^\circ$ (0.5%水溶液)

を有する硫酸化多糖体 D S 4152。

(5) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

(1) 分子量 (ゲルろ過法による)

1240, 840 (肩), 810 (cm^{-1} ; KBr) 25000 ± 3000

(6) 溶解性

(2) 元素分析値

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

メタノール、エタノール等の有機溶媒

N 0.51~0.89% S 1.00~1.17%

には殆ど不溶。

P 0.77~1.06%

(7) 呈色反応

(3) 糖および蛋白質の含量

フェノール-硫酸法、アンスロン-反応、ビ

糖含量 (%) : 57 ± 3 (フェノール-硫酸法、

ムレフト反応およびローリー・フォリン反応

は陽性。水溶液のエルソン・マルガン反応およびムンヒフリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(11) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3% 炭酸水溶液)

(12) 構成糖および炭酸基、炭素の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、 $10H_2$

およびP(炭)の含有量はD-グルコースを10としてそれぞれ10:61:73:6である。

(13) 構成アミノ酸およびアミノ酸

炭加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロアミノピロリン酸、グルコサミンおよびアラニン酸の存在を認める。

本発明は、炭酸基5項記載の血管新生抑制剤。

2. 炭酸化多糖体DP 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する炭酸基剤。

3. 炭酸基剤の用途を説明

(炭酸基剤の用途)

本発明は、肝臓を炭酸化多糖体DP 4152 並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び炭酸基剤並びにこれと更にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び炭酸基剤に關する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、(1)コファカス 19: 17-25 の炭酸基剤中に腫瘍増進作用、癌抑制作用およびインターフェロン誘起作用を有する炭酸化多糖体DP 4639 が存在することが知られて

2. 炭酸化多糖体DP 4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

1. リンネマテ性肉腫、増殖性肉腫、癌、癌性肉腫、未分化肉腫に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4. 炭酸化多糖体DP 4152 を有効成分として含有する炭酸基剤。

2. 炭酸化多糖体DP 4152 と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

4. ステロイドが炭酸基剤: DP 炭酸基剤、炭酸基剤、エストラン炭酸基剤及びアンドロステラン炭酸基剤から選ばれたものである特許請求の範囲第6項記載の血管新生抑制剤。

7. リンネマテ性肉腫、増殖性肉腫、癌、癌性肉腫、未分化肉腫に有効な特許請求の範囲第7項記載の血管新生抑制剤。

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-35329号)。

本発明者らは、炭酸基剤の有用性の期待される炭酸化多糖体DP 4639 について生物学的特性を明らかにすべく検討をこころなした結果、DP 4639 が強い炭酸基剤性を有することを知つた。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この炭酸基剤性を生ずべく、更に研究をこころなしていたところ、DP 4639 は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちのDP 4152 と名づけられた一成分は炭酸基剤性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び炭酸基剤作用を有することを見出した。

更にまた、本発明者は、このDS 4152 とステロイド剤とを組合せると血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されることを見出した。

本発明は、上記の如見に基づくものであり、その目的は、新規な免疫化多糖体DS 4152 を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、免疫化多糖体DS 4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、本発明の他の目的は、免疫化多糖体DS 4152 とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

本明細書中の「血管新生抑制」とは、近の

発育、実体形成、創傷の治癒等に極めて重要だけでなく、淋巴瘤ーマタを含む腫瘍疾患、免疫記憶、腫瘍増殖等の病的状態に於いてもその病体の進展に深く関与している血管の新生作用を抑制することをいう。したがって、血管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が関与する腫瘍症、例えば淋巴瘤性腫瘍、増殖性腫瘍、皮膚癌、胃癌、胆管性腫瘍、未分化腫瘍等の治療、予防に有用なものである。特に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と進展を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の免疫化多糖体DS 4152 は、アルムロ、パクター sp. AT-25 (工業技術院発生

物工業技術研究所には、M100000000 sp. AT-25として、FERM P-5255及びAp100000000 sp. AT-25としてFERM BP-13570の符号で登録されている)の培養物から分離されるDF 4639 (特開昭60-67301号参照)から、その中に含まれる分子量の 1.5×10^4 以上の免疫性物質等を選別する分子量分離法、例えばゲルろ過法や限外ろ過法、アルコール沈殿法で除くことによつて得られる。

すなわち、ゲルろ過法によればDF 4639を適当なゲルろ過媒体、例えば、セファクリル (Sephacryl S-300 (ファルマシア製))を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高速ゲルろ過クロマトグラフィ

(東洋ソーダ製03000 SWカラム使用)を行い、排液限界(ボイド・ボリューム、void volume)にピークを示すフラクション(8画分)とボイド・ボリュームにピークを与えず分子量の $2 \times 10^4 \sim 8 \times 10^4$ の範囲に抽出されるフラクション(1画分)をそれぞれ、透析する。

また、限外ろ過は適当な膜(例えばAmicon社製のYM10、YM30、XM50、PM30やMillon社製のNOVA100、OMEGA100、NOVA50、OMEGA50等特にYM10)を用い、窒素ガスによる加圧またはペリステリフク(peristaltic)ポンプによつて加圧(0.5~5 kg/cm²程度)し、透過液もDS 4152として採ればよい。使用液は、水-エタ

特開昭63-119500 (4)

ノール(10:2~3)または水が適量である。4で乃至重縮を行なうのが一般的である。

得られた各成分内蔵を蒸留後ろ過し、ろ液を乾燥剤のエタノール中に沈降下注することにより生成する白色沈殿を蒸め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥すれば、目的とする08 4152(1成分)と同熱性物質(2成分)が各々得られる。

こうして得られる08 4152 は以下に述べる物理化学的諸性質を示す。下記の物性はそのナトリウム塩についてのものである。

- (1) 分子量(ゲルろ過法による)
29000±3000
- (2) 元素分析値(元素分析の結果を示す)

ルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(7) 着色反応

フェノール-靛藍、アンスロン-靛藍、ビムレフト反応およびローリー・フオリン反応は陽性。水溶液のエルソン・オルガン反応およびメンヒドリン反応も陽性。カルベゾール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3%炭酸水溶液)

(9) 構成糖および炭水化物、糖の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、50%以上およびP(糖)の含有量はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

C 24.42~25.76% N 3.34~3.88%
H 0.51~0.89% S 1.06~1.17%
P 0.77~1.06%

(10) 糖および蛋白質の含量

糖含量(%): 87±3 (フェノール-靛藍法、ガラクトース法)
蛋白質含量(%): 1±0.5 (ローリー・フオリン法、牛血清アルブミン法)

(11) 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} -37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0.5%水溶液)

(12) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

1240, 840 (肩), 810 (μ); KBr)

(13) 溶解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム

(14) 構成アミノ酸およびアミノ酸

炭加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロイソレウシン酸、グルタミン酸およびムラニン酸の存在を認める。

炭上の08 4152 は、後記実施例で示す如く、単独でも血管新生抑制作用を有するものであるが、ステロイド剤と組合せることにより、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤にかいては、08 4152 の代りにヘパリン、低分子ヘパリン等を使用することもある。

炭酸、アプレドニン、6-メチルアプレドニン、デキサメタゾン等ステロイドホルモンが、局所投与、全身投与、ヘルペス

一般に実験的に誘導された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(Cancer Res. 39 1308 (1979) J. Hall, Cancer Inst. 57 789 (1976) 及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 1176 (1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、雄激素コルチコイド(アレドメゾン、アレドメゾン、メタメタゾン等)は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロステンを骨格とする男性ホルモンであるテストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン等が乳癌腫瘍剤として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている (Oncology 10 72 (1964))。

ゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサチンネート、フオスフエート、アタルアセテート、ナトラヒドロフタレート、トリメタルアセテート等)；メタルアレドメゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサチンネート等)；メタメタゾンおよびその誘導体(フオスフエート、バレレート等)が挙げられる。

また、グルココルチコイドOC-11位の水素置換が配位になつた異性体(たとえば、11 α -エビヘイドロコステゾン)も含まれるし、前記グルココルチコイドのナトラヒドロ化合物(グルココルチコイド誘導体の有無は関係しない)も含まれる。

更に、黄体ホルモンであるプロゲステロン、

更にまた、プロゲステロンの誘導体、テストステロンの誘導体およびエストロゲン類が前立腺癌の治療に用いられている。

前記の04 4152 と組合せ用いることのできるステロイド類は、雄激素コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストロゲン類及びアンドロステン類等であり、より具体的には次のものが例示される。

- (1) アレドメソンを骨格とするステロイドホルモンの、すなわちグルココルチコイドであり、たとえばコルチゾンおよびその誘導体(アセテート、エナンテート、ワンドリレート等)；ヘイドロコルチゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサチンネート、カプロエート等)；アレドメゾンおよびその誘導体；アレドメ

ノドキシプロゲステロンおよびその誘導体(アセテート等)；ダイドロゲステロンおよびその17 α -アセトキシ誘導体(デュファストン)等が挙げられる。

更にまた、メタラコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンおよびその誘導体(アセテート、トリメタルアセテート、エナンテート、フエニルプロピオネート等)も挙げられる。

- (2) アンドロステンを骨格とするステロイドホルモンの、すなわち、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンおよびその誘導体(プロピオネート、エナンテート、アタレート、カプリレート等)が挙げられる。また、エビテオステノールおよび

その誘導体、イピタオスチンがあげられる。

さらにフルオキシノステロンおよびその誘導体、ノタルテストロンおよびその誘導体、ステノロンおよびその誘導体も含まれる。

(2) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、妊娠ホルモンであり、たとえば、エストロンおよびその誘導体、エストラジオールおよびその誘導体（ベンゾエート、ジプロピオネート、バレレート、ウンデセノエート等）、エストラジオールおよびその誘導体（トリプロピオネート等）があげられる。

本発明の血管新生抑制剤の用途としては、有効成分を医薬的に許容される媒体、賦形剤を含有する錠々の形態、例えば水または各種の塩液用製剤に溶解させた散剤、錠剤、剤投

剤、錠剤、注射剤、坐剤等が挙げられる。

本発明の血管新生抑制剤が0.1 4152 とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記期間の単剤に調製して混合せ用とすることも、あるいは両成分を混合剤とし調製化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、静脈内、動脈内、経口、皮下、直腸内、結腸内または患部局所内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、0.1 4152 として1~2000mg程度であり、ステロイドは男性ホルモン用、雌化コルチコイド用で10~1000mg、通常30~60mgが通常で、漸減していくのが好ましいことがある。プロゲステロン用では100~1200mgが通常

である。注射による投与の場合は通常経口の1/5量が通常である。

また、本発明の血管新生抑制剤を抗癌剤として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

(発明の効果)

本発明の0.1 4152 はそれ単独でもつても血管新生抑制作用を有するが、これを更にステロイド剤と混合せるとより優れた血管新生抑制作用を有する。

したがって、0.1 4152 単独でもつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と混合させたものは特異的に作用が増強されるので、例えば癌腫血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として特

に有用なものである。

(実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1(A)

特開58-87301号に記載の方法により得られた0.1 4152 (50g) を1.5Mの0.1M NaCl に溶解し、これを0.1M NaCl で平衡化したカラム（セファラールS-300；50×80cm）にかけて何層に於て抽出し、18mlずつ抽出液を集めた。得られたフラクションについて高速ゲル浸透クロマトグラフィー（東洋ソーダ製、03000 SWカラム、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH 6.5）を行い、ポリド・グリコールにピークを求めず、

特開第63-119500(フ)

08 4152 の物理化学的性質および生物学的性質を 0F 4639 とし、その R 値分と比較して示す。

(a) 糖、蛋白、S 値および P 含量 (第 1 表)

第 1 表

	1)	2)	3)	4)
	糖 (%)	S (%)	蛋白 (%)	P (%)
08 4152	56	1.11	1.1	0.88
0F 4639	54	1.08	1.3	0.86
R 値分	42	7.9	7.6	0.72

1) フェノール-炭酸法 (ガラクトース換算)

2) アントノビヤス法 (C.A. Antosyposky, Acta Chem. Scand. 16, 1521 (1962)) による

3) モーリー・フォリン法 (牛血清アルブミン換算)

4) チエンらの方法 (P.S. Chen et al., Anal. Chem. 28, 1756 (1956)) による。

分子量 (デkastラン法) が約 2×10^5 ~ 8×10^5 の範囲に抽出されるフラクションを調り (約 700 ml)、脱イオン水に対して透析した。透析内液を約 50 ml で濃縮後ろ過した。ろ液を約 400 ml のエタノール中へ沈降下層下して、生成した沈降を調り、これを 90% エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥 (50℃, 6 時間) して目的物の 08 4152 の白色粉末 3.6 g を得た。

一方、上記高濃アルブミン過剰マトグラフィーで 0.1F・0.1M にピークを与えるフラクションを調り (約 90 ml)、上述の 08 4152 の場合と同様に処理して、R 値分を白色粉末として 0.18 g を得た。

(b) ガラクトース、グルコース、炭酸基および糖の組成モル比

試体を 1 規定炭酸中 100℃ で 5 時間加水分解しイオン交換樹脂で炭酸処理した後、常法によりアルジトールアセテートとしてガスマトグラフィーで分析した。また、炭酸基および糖のモル比は、S 値および P の含量 (%) から算出した。

第 2 表

	ガラクトース	グルコース	炭酸基	糖
08 4152	0.1	1.0	7.3	0.6
0F 4639	0.2	1.0	7.3	0.6
R 値分	0.2	1.0	6.9	0.6

第 2 表は、グルコースを 1.0 モルとした場

合の各成分のモル比の 1 例である。

(c) 組成アミノ酸およびアミノ糖の同定

08 4152 を 3 規定炭酸中、100℃ で 16 時間加水分解した後、常法によりアミノ酸分析にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、ソアミノ酸、グルタミン酸およびアラニン等のピークを認め、

(d) 比吸光度: $(\alpha)_{25}^0$ ($\alpha = 0.5$, 水)

第 3 表

	比吸光度
08 4152	-37
0F 4639	-36
R 値分	-34

(e) ゲルろ過層出パターン

第 1 図、第 2 図および第 3 図に、それぞれ

特開63-119500(8)

あると推定される。

(N) 発泡性試験

日本薬局方(第10改正)に準じて行った発泡性試験の結果を第4表に示す。

DS 4152、DP 4639 およびE部分の高濃ゲル透過クロマトグラムを示す(参照ソーブ 0.3000 M カラム使用、流速0.1 M 酢酸カリウム緩衝液pH 8.0、0.6 ml/分、標準物質デキストランT-10およびT-40)。

(I) 紫外線吸収スペクトル

2 cm/1%水溶液において220~340 nm

に最大吸収は認められぬ。

(II) 紫外線吸収スペクトル (KBr 錠)

1240、840 (肩) および 810 cm^{-1} に、炭

酸化多環に特徴的な吸収を示す。

DS 4152 の構造としては、主としてD-ガラクトースとD-グルコースから成る糖質部分にムライン酸フェosphateを介してメチルグリコシド結合した炭酸化多環体で

以下余白

第4表

試 体	用 量 mg/10ml	体積上昇度		注				
		個別	計	+	+	+	+	+
DS 4152	75	0.20	0.10	0.15	0.45			
	375	0.20	0.80	0.20	0.90			
DP 4639	15	1.85	1.25	1.40	4.20			
	75	1.40	2.00	1.80	3.20			
	15	1.90	1.40	2.20	5.80			
E部分	75	1.60	1.75	2.65	6.20			

・+ (陽性)、- (陰性)

(I) DS 4152 の急性毒性(マウス、静注)は、LD₅₀が2000 mg/kg以上であつた。

実施例1 (例)

DP 4639 (0.07) を300 mlの水-エタノール(10:3)溶液に溶解し、YM10膜(4.15 μm 、アイコン社製)を用いて、真空で加圧(1.5 kg/cm²)下、重塩化鉛が通した。上記溶液を通加しながら透過液量が約3.4となるまで実施した。透過液の濃縮液(約50 ml)に100 mgの酢酸ナトリウムを加えて溶解した後、遠心分離により得られる上清を約500 mlのエタノール中へ投下し下した。生成した沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(65℃、5時間)してDS 4152

特開昭63-119500 (9)

0白色粉末337を得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す通り、
蛋白、S及びPの含量を除き、実用例1(A)の
DS 4152 と同一であつた。

蛋白含量 56%

S含量 1.13%

蛋白含量 0.9%

P含量 0.92%

高速ゲル透過クロマトグラムを第4図に示す
(63000 SWカラム、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)、0.8 ml/分)。

実用例2

局所性尿蛋白腎生阻止試験(直接法)：

局所を用い、タイラーとフォータマン

(Natl. 297:307, (1962))の方法を—

べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン
を0.5 mg / 局所の量(血管新生に影響のない量)用いた。また、比較として、DP 4639
及びS成分についてもその活性を調べた。この結果を第5表に示す。

第5表

50%血管新生阻止量(ID₅₀値)

	DS 4152	DP 4639	S成分
ID ₅₀ 値 (mg/局所)	3	30	600

実用例4

実用例2と同様な方法で、各種ステロイド
とDS 4152 の併用によるID₅₀値の変化を調べた。この結果、種々のステロイドに10

倍改良した以下の方法で行つた。

局(ノーランクロス)の4~5日間の受荷用
の尿尿に、生理食塩水で溶解したDS 4152
又はヘパリンを添加し、37℃で培養した。

培養後2日後に、尿尿中の血管新生を
生理食塩水のみを添加した対照と比較し、ア
ッセイ法により、50%血管新生阻止量
(ID₅₀値)を算出した。

この結果、本発明のDS 4152 のID₅₀値
は、100 µg であつた。これに対し、ヘパ
リンは、100 µg でも作用を示さなかつた。

実用例3

局所性尿蛋白腎生阻止試験(直接法)：

実用例2と同様な方法で、ステロイドと

DS 4152 を併用した場合の効果について調

べた。DS 4152 を加えれば、それぞれの局
所性尿蛋白腎生阻止活性が10~100倍
に増加することが明らかとなつた(第6表)。

第6表

ステロイド	ID ₅₀ 値(mg/局所)	
	単独	DS 4152 (増加 と併用)
コルチゾンアセテート	120	017 (71倍)
ハイドロコルチゾン	110	016 (69)
プレドニゾン	130	008 (163)
6α-メチルプレドニゾン	115	003 (383)
ベタメタゾン	080	005 (160)
テトラハイドロ	100	001 (1000)
プロゲステロン	102	049 (21)
17β-エストラジオール	112	042 (27)
フルオキシメステロン	124	012 (103)
5α-テストステロン	232	026 (8)

この結果から明らかなように、用量依存的な血管新生抑制作用が認められた。

実施例6

血管新生抑制作用 (in vivo 法) :

実施例5と同様にして、ステロイドと DS 4152 を併用した場合の効果について調べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン を500mg/kg の割合で用い、DS 4152 は300mg/kg または3000mg/kg となるよう調整して加えた。また、比較として OF 4639 及び E 成分を用いた。この結果を第8表に示す。なお、表中の数値は、生理食塩水を同量投与した対照マウスより採取した血漿を添加した皮下組織血管の発達度を100%とした時の阻止率である。

実施例5

血管新生抑制作用 (in vivo 法) :

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR系雄マウスに皮下もしくは経口で投与し、6時間後に血漿を採取した。0.313% フェンチンナトリウムで凝固を阻止し、直接法と同様に5日経受荷荷重法に添加し、2日後に判定した。この結果を第7表に示す。

第7表

投与ルート	投与量 (mg/kg)	血管新生抑制率 (%)
経口	3	-59
	30	264
	300	627
皮下	3	16
	30	378
	300	661

第8表

投与ルート	DS 4152	OF 4639	E 成分
皮下	822%	833%	808%
経口	927%	888%	828%

DS 4152 及び OF 4639 は経口、皮下いずれの経路によっても皮下組織血管新生を抑制することが認められた。

実施例7

血管新生抑制作用 (in vivo 法) :

ICR系雄マウスに、生理食塩水に溶解した DS 4152 を経口投与した。ステロイドは、DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水に溶解して経口または筋肉内投与した。投与6時間後に採血し、0.313% フェン

チンナトリウムで凝固を阻止し、これを直接法と同様に5日経受荷荷重法に添加し、2日後に血管新生に及ぼす効果を確認した。結果は、同量の生理食塩水のみを投与したマウス、6時間経過後の血漿を加えた場合の皮下組織血管の発達度を対照とし、阻止百分率で示した。この結果は第9表の通りである。

以下余白

表9

飼料名 (ルート)	投与量 (mg/kg)	0.5 4152投与量 (mg/kg)	魚の増殖阻止率 (%)
ローソクワセチン (p.o.)	0	0	27
アトニジン (p.o.)	1	30	75.1
アトニジン (p.o.)	0	30	-20
		0	71.7
		30	-123
		0	80.7
		30	40
		0	52
		30	184
		0	234
		100	242
		30	276

表10

飼料名	投与量 (mg/kg)	投与量 (mg/kg)	投与量 (mg/kg)	投与量 (mg/kg)
対照群	0	230±0.18 (100)	0	0
0.5 4152	30	0.99±0.00 (37)	30	33

(a) 投与21日目の平均増殖率±標準偏差、(b) は平均増殖率の割合。
 (c) (a) 投与21日目の平均増殖率±標準偏差、(d) は平均増殖率の割合。

実施例8

投与試験:

C57BL/6雄マウスに同系の群員を5匹、水質をMS076を1×10⁶個以下に調整し、5日目より0.5 4152を30mg/kg、1日1回、6回投与したところ、有名な投与効果と生存日数の有意な延長が認められた。すなわち第10日に示すように移植21日目の腫瘍平均重量は対照群の37% (63%削減) であり、かつノブイオン生存日数が対照群より33%延長した。

腫瘍平均重量は、腫瘍の長さと短さの長さを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{腫瘍平均重量} = (\text{長さ}) \times (\text{短さ}) \times \frac{1}{2}$$

実施例9

投与試験:

IC2系雄マウス (5週齢) にイルコーマ180 (8180) を1×10⁶個以下に調整し、5日目より0.5 4152の生理食塩水懸濁液を250mg/kg/日、0.5割合で3日間、100mg/kg/日、0.5割合で1日投与した。0.5 4152は生理食塩水に溶解し、0.61もしくは0.1mg/kgとなる1日1回以下もしくは毎日4日間投与した。移植7日目に腫瘍を対照と比較したところ第11日に示す如く0.5 4152のみを投与した群では腫瘍重量は生理食塩水投与群と差がなかったが、さらに0.5 4152を投与することにより腫瘍増殖抑制作用が得ら

れ、均等体の乾燥重量の60~125%であつた。

表 1.1 例

試 料	乾燥重量	
	平均収率 % (乾燥)	T/C%
生薬水浸水 (9.0)	Q361± Q191	1000
生薬水浸水 (1.0)	Q361± Q123	1000
乾燥コーチゾン	Q340± Q163	943
01 4152 (Q61mg/..... 9.0)	Q361± Q070	1000
01 4152 (Q1mg/..... 9.0)	Q261± Q077	723
01 4152 (Q61mg/..... 9.0) +乾燥コーチゾン	Q063± Q018	175°
01 4152 (Q1mg/..... 9.0) +乾燥コーチゾン	Q026± Q011	74°
01 4152 (Q61mg/..... 9.0)	Q322± Q071	824
01 4152 (Q1mg/..... 9.0)	Q358± Q115	906
01 4152 (Q61mg/..... 9.0) +乾燥コーチゾン	Q063± Q036	161°
01 4152 (Q1mg/..... 9.0) +乾燥コーチゾン	Q036± Q018	69°

・F<Q06, H<Q01 ステアードントー
決定による

試料は注射用とする。

実施例 1.2

製剤:

01 4152 6mg, プレフェノロン20mg,
乳糖50mg, トラネコキシゲン1.5mg,
カルバマゼピルメチルメロースカルシウム5mg,
ヒドロキシプロピルセルロース3mg及びステ
アリン酸マグネシウム0.5mgを常法に従つて
混合、打錠し、1錠とする。

4. 図面の簡単な説明

第1図をいし第4図は高温ゲル透過クロマ
トグラムである。

以 上

実施例 1.0

製剤:

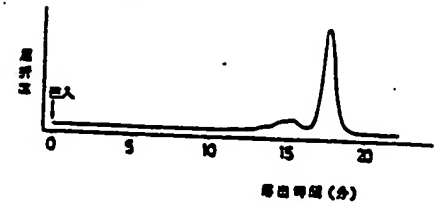
01 4152 6mg, 乳糖300mg, トラネコ
キシゲン1.44mg, カルバマゼピルメ
チルメロースカルシウム30mg及びヒドロキシ
プロピルセルロース30mgを用い、常法に従つ
て500mgの錠剤を調製した。この錠剤
は錠状にわけて1850.0mg~5mgを服用
する。

実施例 1.1

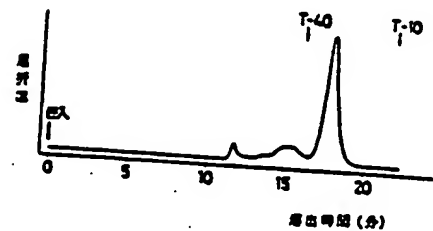
製剤:

01 4152 1.2mg, 塩化ナトリウム90
mgを注射用蒸留水に溶解し、10mlとする。
この溶液をメンブランフィルターでろ過した
後、アンプルに充填し、115℃で30分間

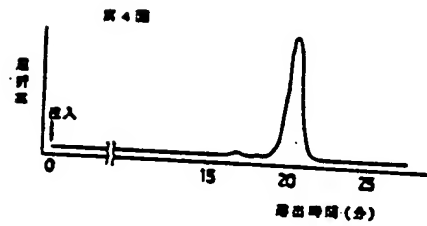
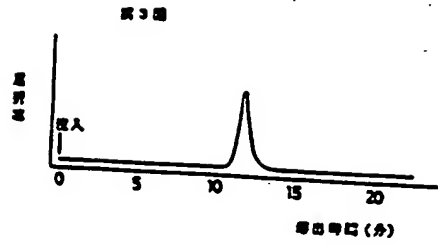
第1図



第2図



特開63-119500 (13)



第1頁の続き

④Int. Cl.⁶

A 61 K 31/725
37/02
C 08 B 37/08
C 12 P 19/04
I(A 61 K 31/725
31:58)

識別記号

ADU
ABE

庁内整理番号

8615-4C
6779-4C
C-8515-4B
7252-4C

発明者 小河 秀正

秀正

東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究
所内